

Aus dem Forschungslaboratorium der Schering AG  
Berlin/Bergkamen  
Department für Endokrinpharmakologie  
Leitung der Abteilung: Prof. Dr. F. Neumann

---

**EINFLUSS EINES NICHT-STEROIDALEN  
ANTIANDROGENS AUF DIE MÄNNLICHE  
SEXUALDIFFERENZIERUNG BEI RATTEN UNTER  
BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER  
INNEREN ABLEITENDEN GESCHLECHTSWEGE**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
an den Medizinischen Fachbereichen  
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von  
Adelheid Koch, Dresden

1984





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41548817\\_0092](https://archive.org/details/IA41548817_0092)



Aus den Forschungslaboratorien der Schering AG  
Berlin/Bergkamen  
Department für Endokrinpharmakologie  
Leiter der Abteilung: Prof. Dr. F. Neumann

---

EINFLUSS EINES NICHT-STEROIDALEN ANTIANDROGENS  
AUF DIE MÄNNLICHE SEXUALDIFFERENZIERUNG BEI RATTEN  
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER INNEREN  
ABLEITENDEN GESCHLECHTSWEGE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
an den Medizinischen Fachbereichen  
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von: Adelheid Koch, Dresden

Referent: Prof. Dr. F. Neumann

Korreferent: Prof. Dr. P. Kaden

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche  
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 17. 7. 1984

## INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                           | Seite |
|---------------------------------------------------------------------------|-------|
| 0. Einleitung                                                             | 4     |
| 1. Fragestellung dieser Arbeit                                            | 7     |
| 2. Material und Methoden                                                  | 9     |
| Tiermaterial                                                              | 9     |
| Durchführung des Versuches                                                | 9     |
| Versuchstiergruppen, Substanzen, Lösungen                                 | 9     |
| Autopsie und Entnahme der Foeten für die<br>histologischen Untersuchungen | 10    |
| 3. Histologische Aufarbeitung                                             | 11    |
| Querschnitttechnik                                                        | 11    |
| Sagittalschnitttechnik                                                    | 11    |
| Auswertung                                                                | 11    |
| 4. Ergebnisse                                                             | 14    |
| Zustand der Foeten und Muttertiere zum Zeit=<br>punkt der Autopsie        | 14    |
| Anogenitalabstand, makroskopisch                                          | 16    |
| Auswertung der Sagittalschnitte                                           | 19    |
| Auswertung der Querschnitte                                               | 23    |
| 5. Histologische Dokumentation der Befunde<br>( Bildanhang )              | 36    |
| 6. Diskussion                                                             | 49    |
| 7. Zusammenfassung                                                        | 55    |
| Literatur                                                                 | 57    |
| Lebenslauf                                                                |       |
| Danksagung                                                                |       |

## O. EINLEITUNG

Die Frage der hormonellen Steuerung der Sexualdifferenzierung konnte erst weitgehendst beantwortet werden, nachdem ein starkes Antiandrogen verfügbar war. Es war die Möglichkeit gegeben, selektiv die Wirkung der Androgene auszuschalten (Hamada et al. 1963, Neumann et al 1970 a, Neumann et al 1970 b, Steinbeck et al 1970, Elger 1966).

Schon die Kastrationsversuche von Jost (Jost 1947 a, b, c, Jost 1965) ließen Rückschlüsse zu, die die Wirkung der Androgene auf die männliche Sexualdifferenzierung aufheben konnten.

Jost kastrierte intrauterin Kaninchenfoeten beiderlei Geschlechts vor Beginn der somatischen Sexualdifferenzierung. Bei der Untersuchung der Foeten kam er zum Schluß, daß - unabhängig vom genetischen und gonadalen Geschlecht - immer eine vollständig weibliche Differenzierung stattfindet (Jost 1953, Jost 1958, Jost 1965).

Die Müller'schen Gänge blieben erhalten, die Wolff'schen Gänge hingegen hatten sich zurückgebildet. Implantierte er kastrierten Kaninchenfoeten Testosteron, so blieben die Wolff'schen Gänge erhalten, daneben aber auch die Müller'schen Gänge. Es entwickelten sich Foeten, die - unabhängig vom genetischen Geschlecht - Wolff'sche und Müller'sche Gänge aufwiesen.

Es ließ sich also durch die Gabe von Androgenen nur ein Teil der Kastrationsfolgen bei den männlichen Tieren aufheben. Durch die Gabe von Antiandrogenen an gravide Muttertiere konnte eine ganz besondere Form der Intersexualität bei männlichen Foeten hervorgerufen werden. Am deutlichsten waren diese Befunde an Hunden (Steinbeck, Neumann, Elger 1970) und Kaninchen (Elger 1966) zu erkennen. Es war klar erkennbar, welche Differenzierungsvorgänge androgenabhängig sind. Es findet keine Stabilisation der Wolff'schen Gänge statt, wenn die Androgene fehlen bzw. nicht zur Wirkung kommen. Männliche akzessorische Geschlechtsdrüsen, z. B. Prostata

und Samenblasen, werden nicht angelegt und auch die Differenzierung des äußeren männlichen Genitales unterbleibt, stattdessen entwickelt sich eine Vagina. Die Androgene sind also essentiell für die Stabilisierung der Wolff'schen Gänge sowie für die Anlage der Prostata und für die Differenzierung des äußeren männlichen Genitales (Neumann 1976, Neumann 1977). Die Gonadendifferenzierung ist ungestört, auch wenn keine Androgene wirksam werden, erfolgt bei chromosomal männlichen Tieren eine Differenzierung in Hoden.

Die meisten Antiandrogene, die bekannt sind, z. B. Cyproteronacetat, Cyproteron, Medrogeston usw., sind Steroide. Manche dieser Antiandrogene, wie z. B. Cyproteronacetat besitzen auch gestagene Eigenschaften. Das bekannteste nichtsteroidale Antiandrogen ist Flutamid, ein Anilinderivat. Die chemische Struktur wird in Abb. 1 gezeigt.

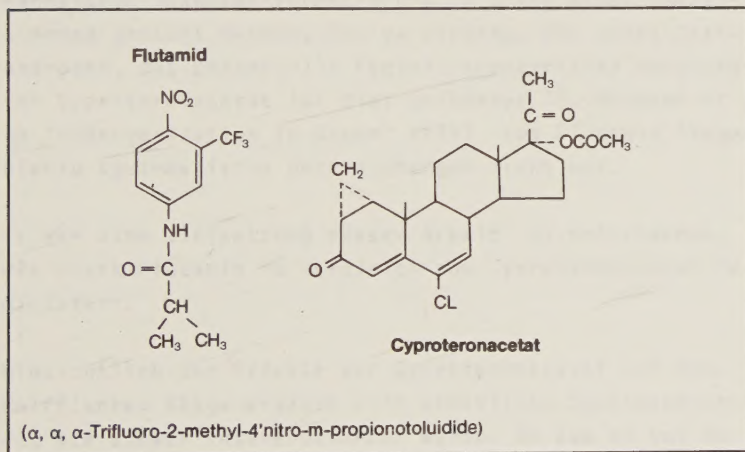


Abb. 1: Chemische Struktur von Flutamid und Cyproteronacetat

Im Gegensatz zu Cyproteronacetat ist Flutamid ein reines Antiandrogen, es besitzt keine gestagenen und somit auch keine antigonadotropen Partialwirkungen.

Der Wirkungsmechanismus ist bei allen Antiandrogenen derselbe, gleichgültig ob es sich um reine Antiandrogene, wie z. B. Flutamid, oder um Antiandrogene vom Typ des Cyproteronacetat handelt. Sie konkurrieren mit Androgenen um den cytoplasmatischen Rezeptor und verhindern die Translokation des Hormonrezeptorkomplexes in den Zellkern (Übersicht bei "Androgenization in Women" 1979 N. Bruchovsky).



## 1. FRAGESTELLUNG DIESER ARBEIT

Für Antiandrogene gibt es eine ganze Reihe von Indikationen. Dazu gehören das Prostatakarzinom, die Pubertas precox, Hypersexualität und Sexualdeviationen bei Männern sowie Androgenisierungserscheinungen der Frau wie Akne, Seborrhoe, Hirsutismus, androgenetische Alopecie. Cyproteronacetat wird in all den genannten Indikationen eingesetzt (Übersicht in "Androgenization in Women" Neumann et al., J. Hammerstein 1979).

Für die Therapie von Androgenisierungserscheinungen der Frau wurde ein cyproteronacetathaltiges Präparat entwickelt, daß ähnlich aufgebaut ist wie ein orales Kontrazeptivum. Es enthält 2 mg Cyproteronacetat und 50 µg Äthynylöstradiol und bietet somit kontrazeptiven Schutz. Es kommt jedoch immer wieder vor, daß die Einnahme dieses Präparates - wie bei anderen oralen Kontrazeptiva auch - in eine schon bestehende Schwangerschaft hinein erfolgt. Da durch Antiandrogene, wie bereits angeführt, verschiedene Schritte der männlichen Sexualdifferenzierung im Sinne einer Feminisierung gestört werden, ist es wichtig, für jedes Antiandrogen, das potentielle Feminisierungsrisiko abzuschätzen. Für Cyproteronacetat ist dies geschehen (F. Neumann et al. in "Androgenization in Women" 1979), zum Flutamid liegen hierzu systematische Untersuchungen nicht vor.

Es war eine Zielsetzung dieser Arbeit zu untersuchen, wie stark Flutamid im Vergleich zum Cyproteronacetat feminisiert.

Hinsichtlich der Effekte von Cyproteronacetat auf die Wolff'schen Gänge ergaben sich erhebliche Speciesunterschiede, die schwer interpretierbar waren. So kam es bei Kaninchen (Elger, W., 1966) und Hunden (Steinbeck, H., Neumann, F., Elger, W. 1970) nach Behandlung der graviden Mütter in der kritischen Phase mit entsprechend hohen Dosen zur Regression der Wolff'schen Gänge bei den männlichen Foeten,

nicht jedoch bei Ratten (Neumann, F., Elger, W., and Steinbeck, H. 1970). Noch verwirrender waren die Befunde an Meerschweinchen. Hier führt die Behandlung der graviden Mütter mit Cyproteronacetat bei den männlichen Foeten zu einer partiellen Feminisierung (Gräf, K.-J. and Neumann, F. 1972), gleichzeitig waren die weiblichen Foeten partiell virilisiert (Gräf, K.-J., Kleinecke, R.-L. and Neumann, F. 1974). Es wurde vermutet, daß bei Meerschweinchen bei der Verstoffwechselung von Cyproteronacetat ein androgen wirksamer Metabolit entsteht.

Es war die zweite Aufgabe dieser Arbeit, speziell darauf zu achten, ob durch Flutamid die Stabilisierung der Wolff'schen Gänge verhindert wird oder nicht.

Zur Beantwortung dieser beiden Fragen - Feminisierungsstärke einerseits, Einfluß auf Wolff'sche Gänge andererseits - mußten zwei histologische Techniken angewandt werden. Die Feminisierungsstärke läßt sich besser in Sagittalschnitten beurteilen (Neumann, F. 1966), zur Beurteilung der Wolff'schen Gänge müssen Querschnitte in Serien angefertigt werden.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### Tiermaterial

Es wurde mit erwachsenen, weiblichen "Han-Wistar"-Ratten von Schering im Gewicht von 140 g - 160 g gearbeitet. Die Haltung der Tiere erfolgte in vollklimatisierten Räumen und standardisiertem Licht-Dunkel-Verhältnis ( 14 h Licht ). Als Futter erhielten sie eine Standarddiät "Altromin"<sup>R</sup>, Wasser stand ad libitum zur Verfügung.

### Durchführung des Versuches

Die Zykluskontrolle geschah durch Vaginalabstriche nach der Methode von Allen und Doisy ( Allen, E. and Doisy, E.A. 1923 ).

Tiere, die am Morgen das Stadium des Proöstrus zeigten, wurden in der darauffolgenden Nacht erwiesenermaßen fertilen männlichen Ratten zugesetzt. Der Nachweis von Spermatozoen im Vaginalabstrich am darauffolgenden Morgen galt als Parameter für die Gravidität. Insgesamt gelangten 35 Tiere in den Versuch. Die Behandlung erfolgte vom 13. bis 21. Tag p.c., die Tiere der Kontrollgruppen erhielten nur das Vehikel. Das Vehikelvolumen betrug 0,4 ml.

### Versuchstiergruppen, Substanzen, Lösungen

Flutamid und Cyproteronacetat wurden in einem Rhizinusöl - Benzylbenzoat- Gemisch im Verhältnis 9 : 1 gelöst.

Die Gruppen und getesteten Dosierungen sind nachfolgender Tabelle 1 zu entnehmen, die Tierzahl pro Gruppe betrug fünf Muttertiere.

Tabelle 1: Versuchsgruppen

| Gruppe | Substanz         | Dosis/Muttertier/Tag |
|--------|------------------|----------------------|
| 1      | Flutamid         | 0,3 mg               |
| 2      | Flutamid         | 1,0 mg               |
| 3      | Flutamid         | 3,0 mg               |
| 4      | Flutamid         | 10,0 mg              |
| 5      | Flutamid         | 30,0 mg              |
| 6      | Cyproteronacetat | 30,0 mg              |
| 7      | Kontrollen       | 0,4 ml Vehikel       |

#### Autopsie und Entnahme der Foeten für die histologischen Untersuchungen

Am 22. Tag der Gravidität wurden die Tiere durch Äthernarkose getötet und die Foeten durch Kaiserschnitt entnommen. Bei den Foeten wurden die Gewichte und die Scheitel- Steißlängen ermittelt, nach Dekapitation erfolgte die Fixierung in Bouin'scher Lösung ( Bouin'sche Lösung: 3 Teile, in Aqua dest., gesättigter Pikrinsäure/1 Teil Formalin 37%. 100 ml dieses Gemisches werden mit 5 ml konz. Essigsäure versetzt ).

Die Mindestfixierdauer betrug 14 Tage.

Bei den fixierten Foeten wurde der Anogenitalabstand mittels einer Schublehre gemessen.

Die Differenzierung der männlichen und weiblichen Foeten erfolgt durch Inspektion der Gonaden. Bei den Kontrollen sind durch Inspektion des äußeren Genitales weibliche und männliche Foeten gut unterscheidbar, nicht jedoch dann, wenn die männlichen Foeten feminisiert sind. Deshalb ist die Inspektion der Gonaden erforderlich. Nur die männlichen Foeten wurden, mit Ausnahme einer weiblichen Kontrollgruppe, aufgearbeitet.

### 3. HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG

#### a) Querschnitttechnik

Die fixierten Foeten wurden in Nabelhöhe durchtrennt, für 24-48 Stunden in 70 % Äthanol eingebracht, im Autotechnikum gewaschen und danach in hartem Paraffin eingebettet.

Schnitttechnik :

Beginnend in Gonadenhöhe wurden 5µ dicke Serienschritte senkrecht zur Körperachse angefertigt. Jeder 10. Schnitt wurde auf einen Objektträger aufgezogen, getrocknet und mit Haematoxylin- Eosin gefärbt.

#### b) Sagittalschnitttechnik

Für die Sagittalschnitte wurde eine 2 - 3mm dicke sagittale Gewebsscheibe aus den fixierten Foeten herausgeschnitten, für 24 - 48 Stunden in 70 % Äthanol eingebracht, im Autotechnikum gewaschen und ebenfalls in hartem Paraffin eingebettet.

Schnitttechnik:

Es wurden 5 µ dicke Serienschritte angefertigt und jeder 10. Schnitt auf einen Objektträger aufgezogen, getrocknet und mit Haematoxylin- Eosin gefärbt.

#### Auswertung

Die Auswertung der Querschnitte erfolgte mit dem Mikroskop. Aus der Anzahl der Serienschritte läßt sich die Länge der Gonadukte ableiten. In den Querschnitten lassen sich Differenzierungsstörungen der Gonadukte ( Wolff'sche und Müller'sche Gänge) der Samenblasen und Prostatae gut erkennen. Allerdings kann die Auswertung nur semiquantitativ erfolgen.

Die Auswertung der Sagittalschnitte erfolgte mit dem MOP (Mikroskopisch optische Bildauswertung). Ermittelt wurde die Länge der Urethra, gemessen von der äußeren Mündung bis zu einer Senkrechten zur Wirbelsäule, die den vorderen Rand der Symphyse trifft (siehe Abb. 2), und die Größe des Anogenitalabstandes, gemessen vom vorderen Rand des Anus bis zur Mündung der Urethra bzw. des Sinusurogenitals (siehe Abb. 2).

Diese beiden Parameter sind sehr gut quantifizierbar.



Abb. 2

Sagittalschnitte eines a) weiblichen und b) männlichen Rattenfoeten:  
ERMITTLUNG DES ANOGENITALABSTANDES UND DER LÄNGE DER URETHRA

-----: Anogenitalabstand, ———: Länge der Urethra

C = Clitoris, H = Harnblase, P = Phallus, R = Rektum, S = Symphyse,  
W = Wirbelsäule, MV = Müller'sche Vagina, SV = Sinusvagina  
WG = Wolff'sche Gang  
Vergrößerung: 18 fach

#### 4. ERGEBNISSE

##### Zustand der Foeten und Muttertiere zum Zeitpunkt der Autopsie

Auffällig war, daß bei der Konzentration von 30 mg Flutamid/Muttertier/Tag von fünf Muttertieren nur ein Tier lebensfähige Foeten aufwies. Bei drei Muttertieren waren Foeten während der Schwangerschaft gestorben. Die Plazenta war deutlich zu erkennen, die Foeten jedoch nekrotisch. Eine Ratte hatte keine Foeten. Ein ähnlicher Befund trat unter der Behandlung mit 30 mg Cyproteronacetat/Muttertier/Tag auf. Von fünf Muttertieren hatten zwei Tiere lebensfähige Foeten. Bei einer Ratte waren von sieben Foeten sechs lebend und ein Foet nekrotisch. Die restlichen zwei Muttertiere wiesen nur abgestorbene Foeten bzw. Placenten auf.

Von allen Foeten wurden die Scheitel-Steiß- Längen gemessen und die Gewichte auf der Schnellwaage bestimmt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Es bestand eine Korrelation zwischen Größe und Gewicht, eine Dosis-Wirkungsbeziehung war nicht erkennbar, d.h. Unterschiede in den gemessenen Parametern sind nicht auf unterschiedliche Größen der Foeten zurückzuführen.

Tabelle 2: Foetengewichte und Scheitel-Steiß-Längen nach Autopsie

| Gruppe | Dosierung<br>mg/Tier/Tag<br>13 - 21 Tage p.c. | Mutter-<br>tier<br>Nr. | Anzahl-<br>der<br>Foeten | Foetengewicht<br>in g<br>MW $\pm$ SEM | Scheitel-Steiß-<br>Länge in mm<br>MW $\pm$ SEM |
|--------|-----------------------------------------------|------------------------|--------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------|
| 1      | 0,3 mg Flutamid                               | 1                      | 13                       | 4,6 $\pm$ 0,1                         | 39,9 $\pm$ 0,9                                 |
|        | "                                             | 2                      | 12                       | 5,8 $\pm$ 0,2                         | 41,2 $\pm$ 0,5                                 |
|        | "                                             | 3                      | 11                       | 4,5 $\pm$ 0,1                         | 38,4 $\pm$ 0,3                                 |
|        | "                                             | 4                      | 10                       | 6,5 $\pm$ 0,2                         | 43,5 $\pm$ 0,5                                 |
|        | "                                             | 5                      | 9                        | 6,9 $\pm$ 0,1                         | 43,9 $\pm$ 0,4                                 |
| 2      | 1 mg Flutamid                                 | 1                      | 11                       | 5,1 $\pm$ 0,1                         | 41,9 $\pm$ 0,3                                 |
|        | "                                             | 2                      | 11                       | 5,1 $\pm$ 0,1                         | 41,1 $\pm$ 0,6                                 |
|        | "                                             | 3                      | 11                       | 4,6 $\pm$ 0,1                         | 38,4 $\pm$ 0,3                                 |
|        | "                                             | 4                      | 10                       | 5,0 $\pm$ 0,1                         | 39,5 $\pm$ 0,3                                 |
|        | "                                             | 5                      | 2                        | 4,7 $\pm$ 0,3                         | 38,5 $\pm$ 1,5                                 |
| 3      | 3 mg Flutamid                                 | 1                      | 11                       | 4,8 $\pm$ 0,1                         | 39,2 $\pm$ 0,3                                 |
|        | "                                             | 2                      | 10                       | 5,2 $\pm$ 0,1                         | 43,2 $\pm$ 0,5                                 |
|        | "                                             | 3                      | 9                        | 5,9 $\pm$ 0,1                         | 45,1 $\pm$ 0,5                                 |
|        | "                                             | 4                      | 9                        | 5,3 $\pm$ 0,1                         | 40,9 $\pm$ 0,5                                 |
|        | "                                             | 5                      | 6                        | 4,7 $\pm$ 0,1                         | 38,7 $\pm$ 0,5                                 |
| 4      | 10 mg Flutamid                                | 1                      | 12                       | 5,3 $\pm$ 0,1                         | 43,2 $\pm$ 0,4                                 |
|        | "                                             | 2                      | 11                       | 4,9 $\pm$ 0,1                         | 42,4 $\pm$ 0,5                                 |
|        | "                                             | 3                      | 11                       | 4,7 $\pm$ 0,1                         | 38,2 $\pm$ 0,3                                 |
|        | "                                             | 4                      | 6                        | 5,3 $\pm$ 0,1                         | 40,3 $\pm$ 0,3                                 |
|        | "                                             | 5                      | 3                        | 5,8 $\pm$ 0,2                         | 43,7 $\pm$ 0,9                                 |
| 5      | 30 mg Flutamid                                | 1                      | 10                       | 4,7 $\pm$ 0,1                         | 42,4 $\pm$ 0,4                                 |
|        | "                                             | 2                      | -                        |                                       |                                                |
|        | "                                             | 3                      | -                        |                                       |                                                |
|        | "                                             | 4                      | -                        |                                       |                                                |
|        | "                                             | 5                      | -                        |                                       |                                                |
| 6      | 30 mg Cyproteron-<br>acetat                   | 1                      | 10                       | 5,0 $\pm$ 0,1                         | 43,1 $\pm$ 0,4                                 |
|        | "                                             | 2                      | 9                        | 4,4 $\pm$ 0,2                         | 36,2 $\pm$ 0,6                                 |
|        | "                                             | 3                      | 7                        | 3,9 $\pm$ 0,7                         | 33,6 $\pm$ 5,6                                 |
|        | "                                             | 4                      | -                        |                                       |                                                |
|        | "                                             | 5                      | -                        |                                       |                                                |
| 7      | Kontrolle                                     | 1                      | 11                       | 6,4 $\pm$ 0,2                         | 43,2 $\pm$ 0,4                                 |
|        | "                                             | 2                      | 8                        | 5,4 $\pm$ 0,1                         | 45,3 $\pm$ 0,8                                 |
|        | "                                             | 3                      | 9                        | 5,2 $\pm$ 0,1                         | 40,4 $\pm$ 0,7                                 |
|        | "                                             | 4                      | 9                        | 4,7 $\pm$ 0,1                         | 39,2 $\pm$ 0,5                                 |
|        | "                                             | 5                      | 11                       | 4,8 $\pm$ 0,1                         | 39,3 $\pm$ 0,4                                 |

Anogenitalabstand, makroskopisch gemessen:

Die Werte sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

Tabelle 3: Makroskopisch gemessene Anogenitalabstände

| Gruppe    | Zahl der untersuchten Foeten | Dosierung Mutter-<br>tier/Tag<br>13.- 21.Tag p.c. | Anogenitalabstand<br>in mm |        |
|-----------|------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------|--------|
|           |                              |                                                   | MW $\pm$                   | S.E.M. |
| 1         | 30                           | 0,3 mg Flutamid                                   | 2,33 $\pm$                 | 0,05   |
| 2         | 25                           | 1 mg Flutamid                                     | 1,92 $\pm$                 | 0,07   |
| 3         | 24                           | 3 mg Flutamid                                     | 1,23 $\pm$                 | 0,03   |
| 4         | 22                           | 10 mg Flutamid                                    | 1,22 $\pm$                 | 0,04   |
| 5         | 4                            | 30 mg Flutamid                                    | 1,18 $\pm$                 | 0,03   |
| 6         | 10                           | 30 mg Cyproteron-<br>acetat                       | 1,13 $\pm$                 | 0,03   |
| Kontrolle | 28 ♀                         | 0,4 ml Vehikel                                    | 1,03 $\pm$                 | 0,03   |
| Kontrolle | 19 ♂                         | 0,4 ml Vehikel                                    | 2,08 $\pm$                 | 0,04   |

Bereits aus den makroskopisch gemessenen Anogenitalabständen lassen sich Veränderungen im Sinne einer Feminisierung des äußeren Genitales erkennen. Mit steigenden Konzentrationen nimmt der Anogenitalabstand ab. Ab einer Dosierung von 10 mg Flutamid/Muttertier/Tag unterscheiden sich die männlichen Foeten praktisch nicht mehr von den weiblichen Kontrollen.

Das gleiche gilt für die positiven Kontrollen (30 mg Cyproteronacetat/Muttertier/Tag).

Dies wird in den nachfolgenden Abbildungen (Abb.3, 4, 5 und 6) veranschaulicht.





Abb. 3: Anogenitalabstand eines männlichen  
Rattenfoeten; Kontrolle



Abb. 4: Anogenitalabstand eines weiblichen  
Rattenfoeten; Kontrolle

ANO = Anogenitalabstand; C = Clitoris; P = Phallus; SUG = Sinusurogenitalis

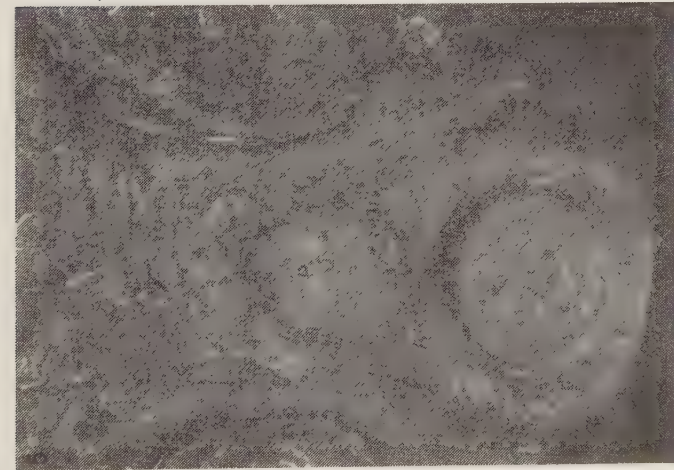


Abb. 5: Anogenitalabstand eines männlichen Rattenfoeten: Muttertier, behandelt mit 30 mg Flutamid/Tier/Tag vom 13. - 21. Tag p.c.

ANO = Anogenitalabstand, P = Phallus, SUg = Sinusurogenital

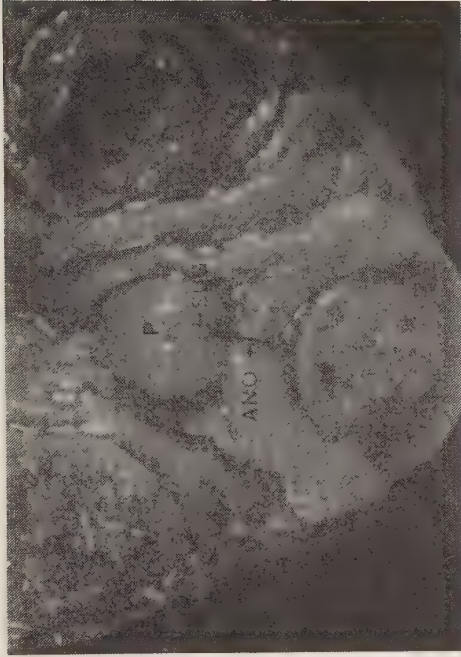


Abb. 6: Anogenitalabstand eines männlichen Rattenfoeten. Muttertier, behandelt mit 30 mg Cyproteronacetat/Tier/Tag vom 13. - 21. Tag p.c.

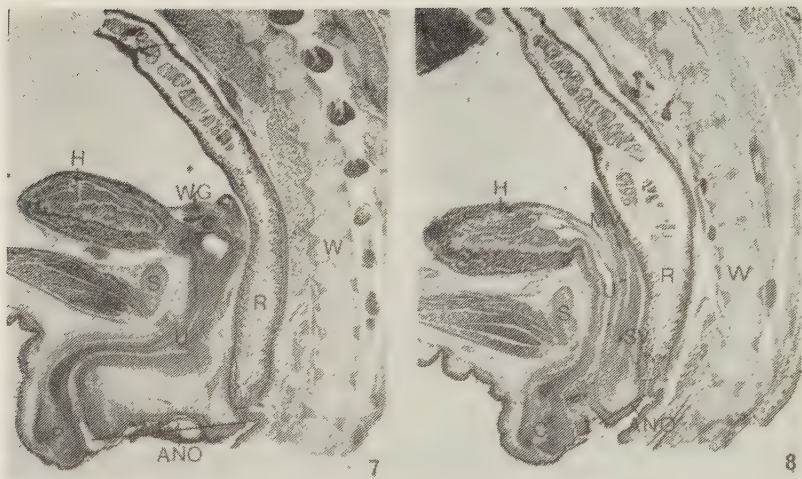


Schon bei der Betrachtung des äußeren Genitals läßt sich eine Verlagerung der Urethramündung im Sinne einer Hypospadie bei den Foeten erkennen, deren Mutter mit den höheren Dosen Flutamid bzw. mit 30 mg Cyproteronacetat/Muttertier/Tag behandelt worden waren.

#### AUSWERTUNG DER SAGITTALSCHNITTE

Die männlichen Kontrollen zeigen den typisch S-förmigen Verlauf der Urethra und den bei der normalen männlichen Sexualdifferenzierung breiten Anogenitalabstand (s. Abb.7).

Abb. 8 zeigt zum Vergleich die Verhältnisse bei weiblichen Kontrollen. Abb. 9 - 12 zeigen repräsentative Sagittalschnitte von männlichen Foeten, deren Mütter mit 0,3, 1,3 sowie 10 mg Flutamid/Tier/Tag behandelt worden waren. Die feminisierende Grenzdosis liegt zwischen 0,3 und 1 mg. Bei der Dosis von 0,3 mg liegen zumindest qualitativ noch normale Verhältnisse vor. Die Urethra ist noch S-förmig, der Anogenitalabstand ist groß, die Urethra liegt zentral im Phallus. Bei der nächst höheren Dosis von 1 mg ist die Urethra nicht mehr S-förmig, die Dammbreite entspricht eher den normalen weiblichen Verhältnissen, offensichtlich liegt eine Hypospadie vor. Bei Behandlung der Mütter mit noch höheren Dosen ändert sich qualitativ nicht mehr viel. Gut erkennbar ist bei der 10 mg Dosis die Anlage der Sinusvagina.



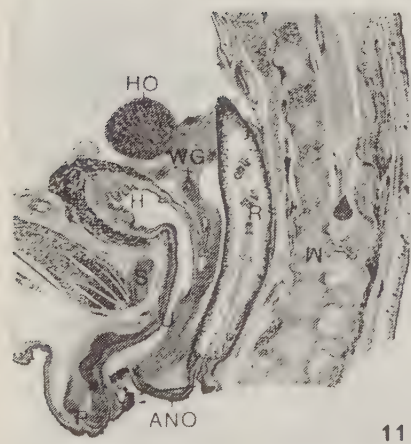
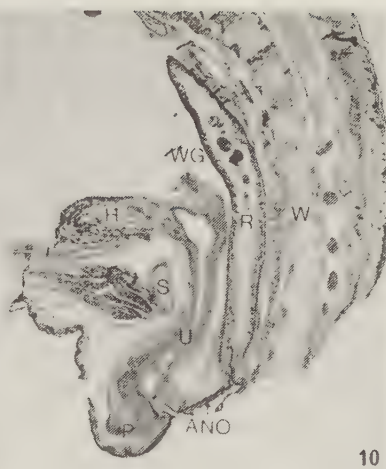
Sagittalschnitte durch Rattenfoeten, deren Muttertiere vom 13. - 21. Tag p. c. behandelt wurden mit:

Abb. 7: männliche Kontrolle, Abb. 8: weibliche Kontrolle,

Abb. 9: 0,3 mg Flutamid/Muttertier/Tag, Abb. 10: 1 mg Flutamid/Muttertier/Tag, Abb. 11: 3 mg Flutamid/Muttertier/Tag, Abb. 12: 10 mg Flutamid/Muttertier/Tag

ANO = Anogenitalabstand, C = Clitoris, H = Harnblase, HO = Hoden, MV = Müller'sche Vagina, P = Penis, R = Rektum, S = Symphyse, SV = Sinus Vagina, U = Urethra, W = Wirbelsäule, WG = Wolff'sche Gang

Vergrößerung: 18fach



In Tabelle 4 werden die mikroskopisch gemessenen Anogenitalabstände und Urethralängen angegeben.

Tabelle 4: Anogenitalabstände und Länge der Urethra (mikroskopisch gemessen)

| Gruppe | Zahl der untersuchten Foeten | Dosierung/<br>Muttertier/Tag<br>13. - 21. T.p.c. | Anogenital-<br>abstand in mm<br>MW $\pm$ SEM | Urethralänge<br>mm<br>MW $\pm$ SEM |
|--------|------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------|
| 1      | 9                            | 0,3 mg                                           | 2,06 $\pm$ 0,06                              | 4,28 $\pm$ 0,07                    |
| 2      | 7                            | 1 mg                                             | 1,57 $\pm$ 0,10                              | 3,23 $\pm$ 0,12                    |
| 3      | 8                            | 3 mg                                             | 1,00 $\pm$ 0,03                              | 2,27 $\pm$ 0,12                    |
| 4      | 7                            | 10 mg                                            | 0,95 $\pm$ 0,05                              | 2,16 $\pm$ 0,08                    |
| 5      | *                            | 30 mg                                            |                                              |                                    |
| 6      | *                            | Cyproteron-<br>acetat                            |                                              |                                    |
| Kontr. | 10                           | 0,4 ml Veh.                                      | 2,56 $\pm$ 0,04                              | 4,75 $\pm$ 0,08                    |
| Kontr. | 8                            | 0,4 ml Veh.                                      | 0,88 $\pm$ 0,04                              | 2,08 $\pm$ 0,07                    |

\* Bedingt durch die hohe Embryolethalität in diesen beiden Gruppen reicht die Zahl der Foeten nur für die Untersuchungen zur Differenzierung der Gonodukte (Querschnitttechnik) aus.

Die Dosisabhängigkeit der Feminisierung kommt anhand der gemessenen Werte für den Anogenitalabstand und die Länge der Urethra sehr gut zum Ausdruck, wobei bei einer Dosis von 3 mg schon fast die Werte der weiblichen Kontrollen erreicht wurden.

## AUSWERTUNG DER QUERSCHNITTE

Eine histologische Dokumentation der Befunde findet sich am Ende des Ergebnisteils, wobei die Anordnung nach den entsprechenden Strukturen erfolgte.

### Gruppe 1 = 0,3 mg Flutamid/Muttertier/Tag

In dieser Gruppe wurden 10 männliche Foeten untersucht. Die Hoden sind normal entwickelt. Die Nebenhoden entsprechen in ihrer Struktur denen der männlichen Kontrollen, lediglich bei einem Foeten erscheinen die Nebenhodengänge etwas weniger gut entwickelt. Beide Wolff'sche Gänge sind gut entwickelt.

Das Epithel ist zylindrisch. Die Samenblasen weisen ein großes Lumen auf, sie sind regelrecht entwickelt und gleichen qualitativ denen der Kontrollen. Sie lassen sich linksseitig über 80, rechtsseitig über 75 Schnitte verfolgen und sind somit etwas kürzer als bei den Kontrollen.

Die Wolff'schen Gänge und die Samenblasen vereinigen sich zu den Ducti ejaculatorii, die dann direkt in den Sinus urogenitalis bzw. in die Urethra münden.

Der Utriculus prostaticus hat normale Ausmaße und läßt sich über 20 Schnitte verfolgen. Sein Müller'sches Epithel geht in das Sinusepithel des Sinus urogenitalis über und zeigt keine Unregelmäßigkeiten.

Die Entwicklung der Prostata erscheint jedoch schon bei der geringen Konzentration von 0,3 mg beeinflußt zu sein.

Die Anzahl der Prostatasprossen ist geringer als bei den Kontrollen.

Eine Vagina ist nicht vorhanden.

Die Glandarlamelle umschließt den Sinusurogenitalis vollständig.

Gruppe 2 = 1 mg Flutamid/Muttertier/Tag

10 männliche Foeten standen für diese Gruppe zur Verfügung. Beide Wolff'schen Gänge sind in ihrer gesamten Länge dargestellt. Aufgefallen ist, daß das Lumen teilweise sehr klein ist. Bei 5 Foeten ist der Durchmesser geringer als bei den Kontrollen oder der Gruppe 1, jedoch nicht über die gesamte Länge. Teilweise ist nur der rechte Gang betroffen, gelegentlich aber auch beide Gänge. Kleinere Durchmesser zeigen sich mitunter erst in Höhe der Samenblasen. Das Wolff'sche Epithel weist keine Besonderheiten auf. Beide Gänge erstrecken sich über 200 Schnitte und sind somit wenig kürzer als bei den Kontrollen.

Die Gesamtlänge der Samenblasen ist ebenfalls wenig kürzer als bei den Kontrollen. Das Epithel weist keine Unregelmäßigkeiten auf. Sie bilden zusammen mit den Wolff'schen Gängen die Ducti ejaculatorii, die nicht von denen der Kontrollen abweichen.

Auch der Utriculus prostaticus entspricht in seinem Ausmaß dem der Kontrolle.

Einen deutlichen Einfluß von Flutamid kann an der Anzahl der Prostatasprossen erkannt werden. Nur 7 Sprossen liegen vor. Eine Vagina ist nicht angelegt.

Die Glandarlamelle umschließt nicht mehr vollständig den Sinus urogenitalis, die Urethra ist exzentrisch zum Damm hin verlagert.

Gruppe 3 = 3 mg Flutamid/Muttertier/Tag

In dieser Gruppe standen 10 männliche Foeten zur Verfügung. Die Wolff'schen Gänge sind bei allen Foeten in ihrer gesamten Länge dargestellt. Alle Wolff'schen Gänge sind länger als die der Kontrollen. Das Epithel weist keine Unregelmäßigkeiten auf. Es fällt auf, daß das Lumen bis zum Ende hin - noch bevor die Vereinigung mit den Samenblasen stattfindet - sehr eng wird.

Bis zum Auftreten der Samenblasen erstrecken sich die Wolff'schen Gänge links über 190, rechts über 175 Schnitte. Das würde bedeuten, daß der Descensus testes noch nicht so weit fortgeschritten ist wie bei den vorangegangenen Gruppen, so daß die Wolff'schen Gänge länger sein müssen.

Die Samenblasen sind kürzer als die der Kontrollen. Sie weisen keine Besonderheiten auf.

Bei 4 Tieren münden die Ducti ejaculatorii in den Utriculus prostaticus, der ein sehr großes Lumen besitzt, auch ist die Form im Vergleich zu den Kontrollen und zu den Gruppen 1 und 2 verändert. Er besitzt eine dreieckige Form und ist - bei Erreichen seines größten Durchmessers - nicht mit Müller'schem Epithel sondern mit einschichtigem Epithel ausgekleidet wie es auch die Ducti ejaculatorii besitzen.

4 Foeten haben einen kleinen Utriculus, der nicht mit den Ducti ejaculatorii in Verbindung steht. Bei 2 Foeten ist kein Utriculus feststellbar.

Die Ducti ejaculatorii münden in den Sinus urogenitalis, entweder über den Utriculus prostaticus wie bei den angegebenen 4 Foeten oder, wie bei den restlichen 6, direkt. Bei 7 Tieren ist eine Vagina erkennbar, das heißt, das Epithel des Sinus urogenitalis verbindet sich mit dem Epithel der Ducti ejaculatorii und des Utriculus zu einer Sinusvagina. Der Utriculus unterscheidet sich in seiner Länge gering von der Kontrolle.

Beim Sinus urogenitalis fällt auf, daß sich seine Gestalt langsam ändert. Ist bei den Kontrollen sowie bei den Gruppen 1 und 2 noch eine herzförmige Gestalt anzufinden, so kann hier bemerkt werden, daß der Sinus in Höhe der Ducti ejaculatorii und des Utriculus prostaticus eine längliche Form annimmt. Auch ist das Auskleidungsepithel vermehrt und ungleichmäßig verbreitert.

Die Anzahl der Prostatasprossen zeigt eine starke Abnahme im Vergleich zur Kontrolle. Nur 3 Sprossen werden festgestellt.

Die Mündung der Urethra - man spricht wohl besser schon vom Sinus urogenitalis - ist außerhalb des Phallus. Es liegt also eine Hypospadie vor. Die Glandarlamelle ist demzufolge weit offen.

Gruppe 4 = 10 mg Flutamid/Muttertier/Tag

In dieser Gruppe standen 10 männliche Foeten zur Verfügung. Auffällig ist, daß die Nebenhodentubuli in ihrer Zahl vermindert erscheinen.

Die Wolff'schen Gänge sind bei allen Tieren in ihrer gesamten Länge voll stabilisiert. Gegenüber der Kontrolle sowie gegenüber den Gruppen 1, 2 und 3 sind sie wesentlich länger. Sie erstrecken sich links über 400, rechts über 360 Schnitte. Der linke Gang ist auch hier - wie bei allen Gruppen - länger als der rechte. Es ist anzunehmen, daß der Descensus testes verzögert ist. Dies zeigt sich auch in der Zahl der Schnitte bis zum Auftreten der Samenblasen.

Die Länge der Samenblasen entspricht denen der Kontrollen. Die Wolff'schen Gänge und die Samenblasen vereinigen sich zu den Ducti ejaculatorii, die in dieser Gruppe durch ihr großes Lumen auffallen. Bei 3 Tieren sind sie extrem groß. Sie erstrecken sich beidseitig über 60 Schnitte und sind somit doppelt so lang wie bei den Kontrolltieren.

Bei einem Foet münden die Ducti ejakulatorii direkt in die Urethra, bei 2 Foeten nur der linke Gang, ohne sich vorher mit dem Utraculus prostaticus zu verbinden. Bei den restlichen 7 Foeten führen die Ducti ejaculatorii in den Utriculus, der durch sein großes Lumen auffällt. Ausgekleidet ist er zu den Ducti ejaculatorii hin mit einschichtigem Epithel, ebenso wie die Ducti ejaculatorii selbst, zur Urethra hin dagegen mit unregelmäßigem mehrschichtigen Epithel. Der Utriculus prostaticus erstreckt sich über 60 Schnitte. Der Utriculus verbindet sich caudalwärts mit der Urethra, das Epithel des Utriculus verschmilzt mit dem Epithel der Urethra und es bildet sich eine Sinusvagina, die bei allen 10 Foeten auftritt.

Die Urethra hat bei Einmündung der Ducti ejaculatorii in den Utriculus prostaticus eine kleine, runde Form, die in keiner Weise der Kontrolle ähnelt.

Die Anzahl der Prostatasprosse hat erneut stark abgenommen. Es sind durchschnittlich 2 Sprosse erkennbar. Je ein Spross seitlich der Urethra.

Die Glandarlamelle ist zum Damm hin geöffnet und die Mündung des Sinus urogenitalis ist exzentrisch zum Damm hin verlagert. Es liegt also eine Hypospadie vor.

Gruppe 5 = 30 mg Flutamid/Mutttertier/Tag

Für diese Gruppe standen nur 4 männliche Foeten zur Verfügung, da von 3 Mutttertieren die Foeten während der Schwangerschaft gestorben waren und ein Mutttertier keine Foeten hatte, obwohl Spermien im Vaginalabstrich nachgewiesen werden konnten.

Diese Dosis wirkte bereits stark fötotoxisch.

Bei den Nebenhoden sind die Tubuli vermindert.

Die Wolff'schen Gänge sind in ihrer gesamten Länge dargestellt. Ihr Epithel ist mehrschichtig und erst in Höhe der Samenblasen wandelt es sich in einschichtiges Epithel um, was auch den Kontrollen entspricht. Die Wolff'schen Gänge sind kürzer als in Gruppe 4. Das Lumen ist klein. Beide Gänge liegen sehr dicht beieinander und haben, nach Auftreten der Samenblasen, eine kleine ovale Form.

Bis zur Erreichung der Samenblasen erstrecken sich die Wolff'schen Gänge links über 220, rechts über 180 Schnitte.

Die Samenblasen fallen ebenfalls durch ein kleines Lumen auf, jedoch ist die Gesamtlänge größer als bei allen anderen Gruppen und bei den Kontrollen.

Noch bevor Wolff'sche Gänge und Samenblasen sich vereinigen, hat sich der Utriculus prostaticus gebildet. Er ist zu den Wolff'schen Gängen und zu den Samenblasen hin mit einem einschichtigen Epithel ausgekleidet, zur caudalen Seite mit unregelmäßigem mehrreihigen Epithel. Die Form des Utriculus ist zu Beginn queroval, dann mehr rechteckig, schließlich viereckig.

Der Utriculus prostaticus erstreckt sich über 80 Schnitte und fällt durch sein großes Lumen auf.

Erst nach 40 Schnitten des Utriculus prostaticus werden aus den Wolff'schen Gängen und den Samenblasen die Ducti ejaculatorii. Sie haben ein kleineres Lumen, sind hingegen länger als in Gruppe 4. Beide münden in den Utriculus prostaticus, der dann caudalwärts in die Urethra mündet unter Bildung einer Sinusvagina.

Eine Vagina war bei allen Foeten erkennbar.

Die Anzahl der Prostatasprosse lag im Durchschnitt unter 1, nur 1 Foet hatte einen Spross, bei den übrigen Tieren hatten sich keine Prostatasprosse entwickelt.

Es liegt eine ausgeprägte Hypospadie vor.

Gruppe 6 = 30 mg Cyproteronacetat/Mutttertier/Tag

In dieser Gruppe standen 10 männliche Foeten zur Verfügung. Die Zahl der Nebenhodentubuli ist reduziert.

Die Wolff'schen Gänge sind in ihrer gesamten Länge dargestellt.

Der Einfluß von 30 mg Cyproteronacetat/Mutttertier/Tag auf die Länge der Wolff'schen Gänge scheint nicht so stark ausgeprägt zu sein wie bei der Gruppe 5 (30 mg Flutamid) oder gar der Gruppe 4 (10 mg Flutamid), welche ja die größte Längenveränderung im Vergleich zu den Kontrollen aufweisen. Flutamid ist also in dieser Hinsicht wirksamer als Cyproteronacetat. Der Durchmesser ist, im Vergleich zur Kontrolle, geringer, was besonders auffällig ist in Höhe der Samenblasen. Das mehrschichtige Epithel verändert sich nicht immer nach Auftreten der Samenblasen in ein einreihiges Epithel, sondern es bleibt mehrreihig.

Die Länge der Samenblasen ist geringer als bei den Foeten in Gruppe 5 und 4. Offensichtlich ist auch hier Flutamid hinsichtlich dieses Parameters wirksamer als Cyproteronacetat. Samenblasen und Wolff'sche Gänge vereinigen sich zu den Ducti ejaculatorii, die bei 2 Foeten ein sehr großes Lumen aufweisen, vergleichbar mit den Befunden der Gruppe 4 ( 10 mg Flutamid). Die Länge ist vergleichbar mit der in der Gruppe 5 ( 30 mg Flutamid ). Auffällig ist im Vergleich zur Gruppe 5, daß der Utriculuc prostaticus erst nach der Vereinigung von Wolff'schen Gängen und Samenblasen auftritt, was bedeuten würde, daß der Utriculus kleiner sein muß. Nur bei 2 Foeten tritt der Utriculus noch vor der Vereinigung der Samenblasen und Wolff'schen Gänge zu den Ducti ejaculatorii auf. Der Utriculus prostaticus selbst weist nicht so einen großen Durchmesser auf, noch entspricht er in der Länge den Verhältnissen in Gruppe 5. Die Form beginnt quere oval und geht dann in eine mehr dreieckige Form über. Ausgekleidet ist er mit einreihigem Epithel - den Ducti ejaculatorii zugewendet, zum Sinus urogenitalis hin jedoch mit mehrreihigem unregelmäßigen Epithel. Der Utriculus erstreckt sich über 40 Schnit-

te und zeigt damit eine deutliche Abweichung gegenüber den Verhältnissen in Gruppe 5 bzw. 4.

Die Ducti ejaculatorii münden in den Utriculus, der dann nach einigen Schnitten in die Urethra übergeht und somit eine Vagina andeutet.

Die Anzahl der Prostatasprosse liegt bei 2.

Es liegt eine Hypospadie vor (offene Glandarlamelle, exzentrische Verlagerung des Sinus urogenitalis).

Tabelle 5: Semiquantitative Errechnung der Länge der Wolff'schen Gänge, der Samenblasen und der Ducti ejaculatorii sowie des Utriculus prostaticus, Zahl der Prostata-sprossen und Bildung einer Sinusvagina.  
(Die Werte für die Längenangaben sind nicht absolut, vielmehr wird die Anzahl der histologischen Schnitte angegeben, über die eine bestimmte Struktur verfolgt werden konnte.)

| Gruppe | Dosierung<br>mg/Muttertier/<br>Tag<br>13.-21. Tag p.c. | Anzahl<br>der unter-<br>suchten<br>Foeten | Wolff'sche Gänge                                        |     |     |     | Samenblasen |     |     |     | Ducti<br>ejaculatorii | Utriculus<br>prosta-<br>ticus | Prostata-<br>sprossen | Vagina |
|--------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|--------|
|        |                                                        |                                           | Gesamtlänge bis zum Auf-<br>treten der Sa-<br>menblasen |     |     |     |             |     |     |     |                       |                               |                       |        |
|        |                                                        |                                           | re.                                                     | li. | re. | li. | re.         | li. | re. | li. |                       |                               |                       |        |
| 1      | 0,3 mg Flutamid                                        | 10                                        | 250                                                     | 240 | 180 | 170 | 80          | 80  | 30  | 30  | 20                    | 10                            | -                     |        |
| 2      | 1 mg Flutamid                                          | 10                                        | 230                                                     | 200 | 160 | 150 | 80          | 70  | 30  | 20  | 20                    | 7                             | -                     |        |
| 3      | 3 mg Flutamid                                          | 10                                        | 270                                                     | 250 | 190 | 180 | 80          | 80  | 50  | 40  | 30                    | 3                             | +7Foeten<br>-3Foeten  |        |
| 4      | 10 mg Flutamid                                         | 10                                        | 400                                                     | 360 | 310 | 270 | 100         | 100 | 60  | 70  | 60                    | 2                             | +                     |        |
| 5      | 30 mg Flutamid                                         | 4                                         | 340                                                     | 300 | 220 | 180 | 110         | 110 | 70  | 70  | 80                    | 1                             | +                     |        |
| 6      | 30 mg Cypro-<br>teronacetat                            | 10                                        | 310                                                     | 300 | 250 | 220 | 80          | 60  | 70  | 70  | 40                    | 2                             | +                     |        |
| Kontr. | 0,4 ml Vehikel                                         | 5                                         | 280                                                     | 240 | 220 | 120 | 100         | 90  | 30  | 30  | 20                    | 12                            | -                     |        |

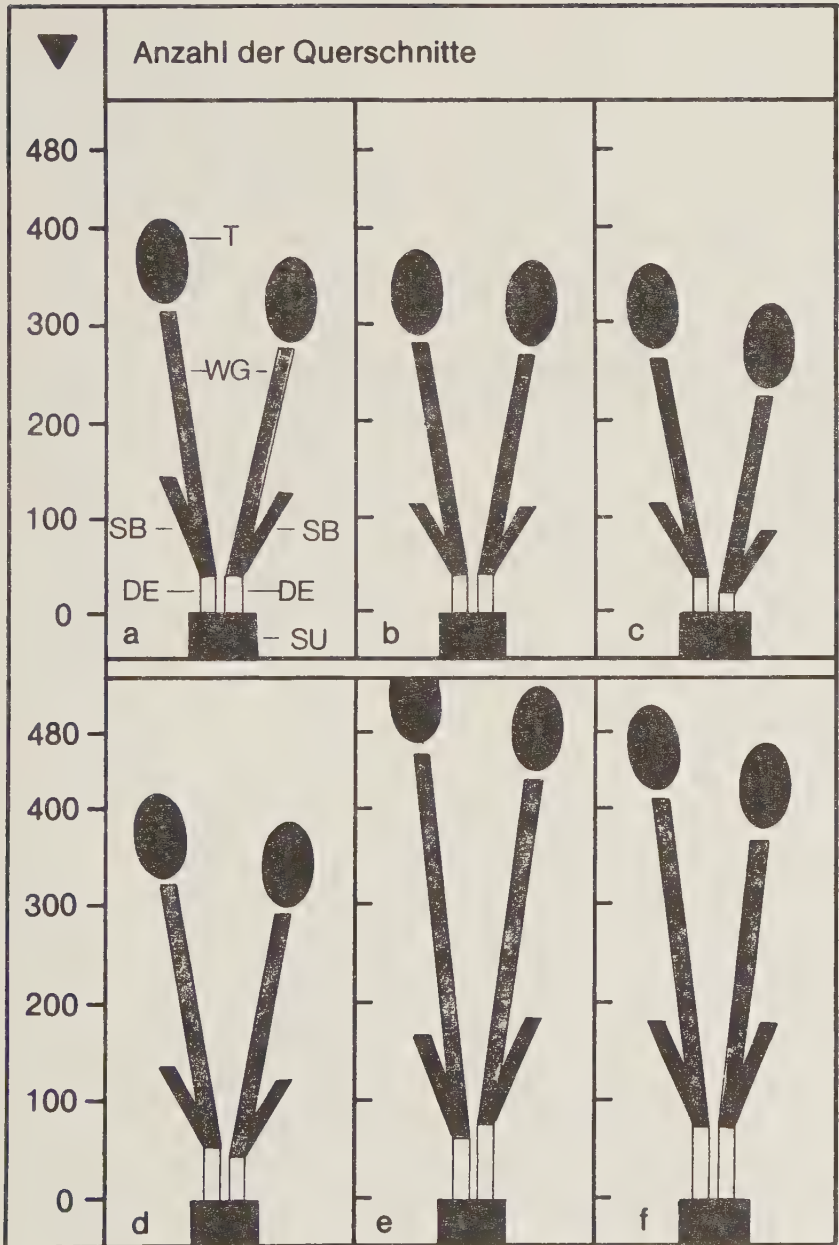
re. = rechts

li. = links

Abb. 13: Schematische Darstellung des EINFLUSSES VON FLUTAMID AUF DIE LÄNGE DER WOLFF'SCHEN GÄNGE, DER SAMENBLASEN UND DER DUCTI EJACULATORII

- a) männliche Kontrolle; b) 0,3 mg Flutamid/Muttertier/Tag;  
c) 1 mg Flutamid/Muttertier/Tag; d) 3 mg Flutamid/Muttertier/Tag;  
e) 10 mg Flutamid/Muttertier/Tag; f) 30 mg Flutamid/Muttertier/  
Tag

DE = Ducti ejaculatorii; T = Testis; SB = Samenblasen; SU = Sinus urogenitalis; WG = Wolff'sche Gänge





5. HISTOLOGISCHE DOKUMENTATION DER BEFUNDE

( Bildanhang )

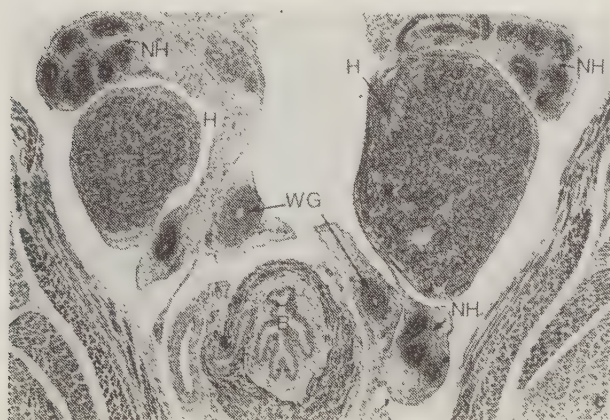
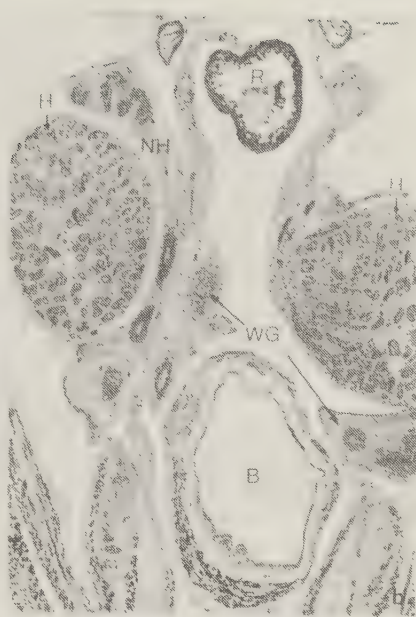
Abb. 14 zeigt die ABNAHME DER NEBENHODENGÄNGE bei Rattenfoeten nach Behandlung der Mütter MIT FLUTAMID BZW. CYPROTERONACETAT vom 13. - 21. Tag p.C.

a) männliche Kontrolle; b) 30 mg Flutamid/Tag; c) 30 mg Cyproteronacetat/Tag

Die Wolff'schen Gänge zeichnen sich deutlich ab.

Vergrößerung: a) 18fach, b + c) 45fach

B = Harnblase; H = Hoden; NH = Nebenhoden; WG = Wolff'sche Gänge;  
R = Rektum



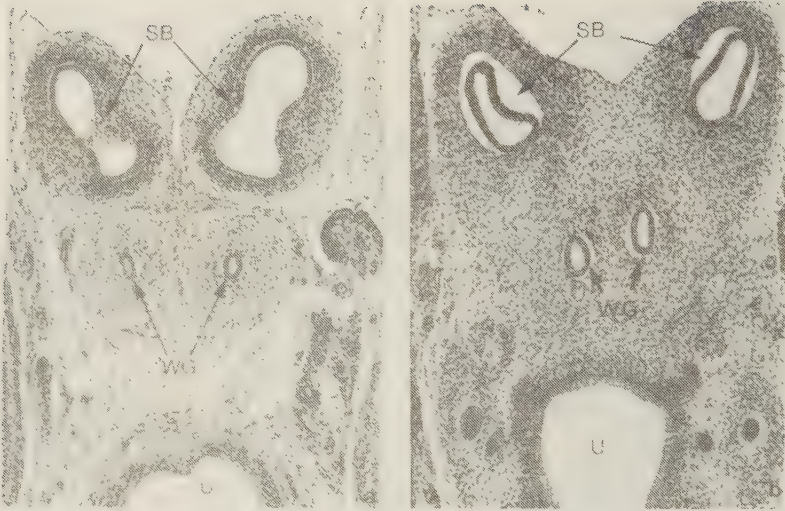


Abb. 15: DER EINFLUSS VON FLUTAMID AUF DIE WOLFF'SCHEN GÄNGE UND DIE SAMENBLASEN:

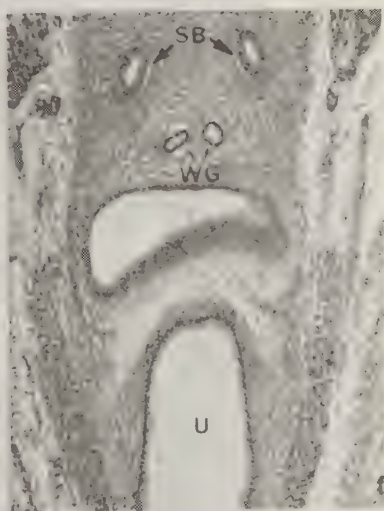
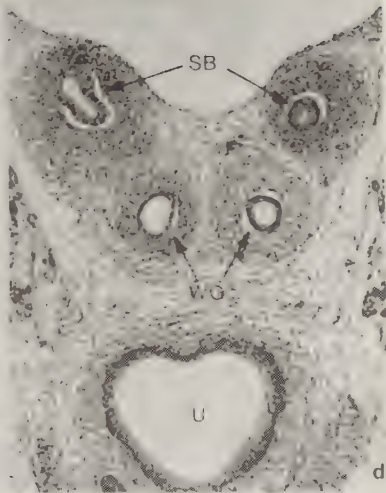
Querschnitte durch männliche Rattenfoeten, deren Mütter vom 13. - 21. Tag p.c. behandelt wurden.

a) männliche Kontrolle; b) 0,3 mg Flutamid/Tag; c) 1 mg Flutamid/Tag; d) 3 mg Flutamid/Tag; e) 10 mg Flutamid/Tag; f) 30 mg Flutamid/Tag.

Auf den Querschnitten ist die teilweise vorhandene Dilatation der Wolff'schen Gänge erkennbar, obwohl mit zunehmender Dosis an Flutamid der Durchmesser abnimmt (f), was nicht so deutlich auf diesen Querschnitten zum Ausdruck kommt. Klar erkennbar ist jedoch die enge Nachbarschaft der beiden Gänge zueinander, die sich verstärkt unter dem Einfluß steigender Dosen von Flutamid. An den Samenblasen erkennt man die deutliche Verringerung des Lumens in Abhängigkeit von der Dosis.

Vergrößerung: a) 45fach, b - e) ca. 115fach, f) ca. 45fach

SB = Samenblasen; U = Urethra; WG = Wolff'sche Gänge



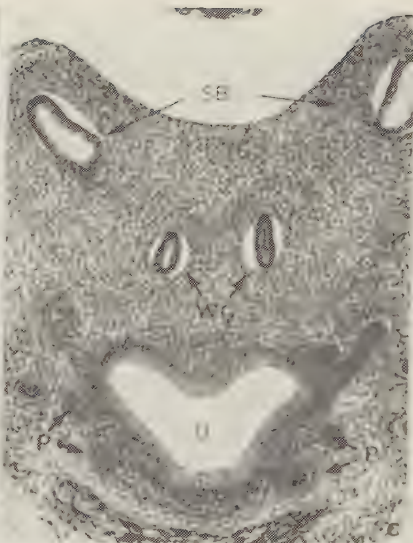
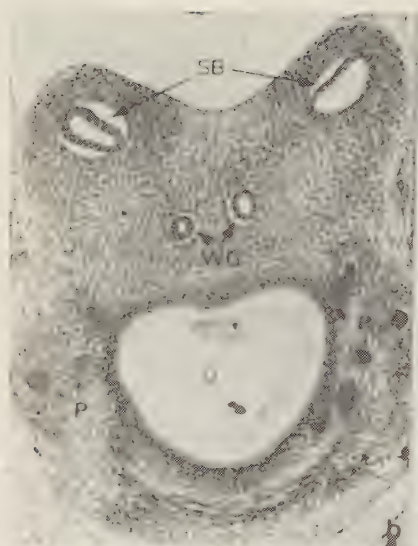


Abb. 16: DER EINFLUSS VON FLUTAMID AUF DIE PROSTATAENTWICKLUNG:

Querschnitt durch männliche Rattenfoeten, deren Mütter vom 13. - 21. Tag p. c. behandelt wurden.

a) männliche Kontrolle; b) 0,3 mg Flutamid/Tag; c) 1 mg Flutamid/Tag.

Deutlich ist die dosisabhängige Hemmung der Prostataentwicklung.

Die Form der Urethra ändert sich ebenfalls dosisabhängig.

Vergrößerung: a und b) ca. 115fach, c) ca. 130fach

P = Prostatasprosse; SB = Samenblase; R = Rektum; U = Urethra;

WG = Wolff'sche Gänge; DE = Ductus ejaculatorii

Fortsetzung von Seite 42

Abb. 16: DER EINFLUSS VON FLUTAMID AUF DIE PROSTATAENTWICKLUNG:

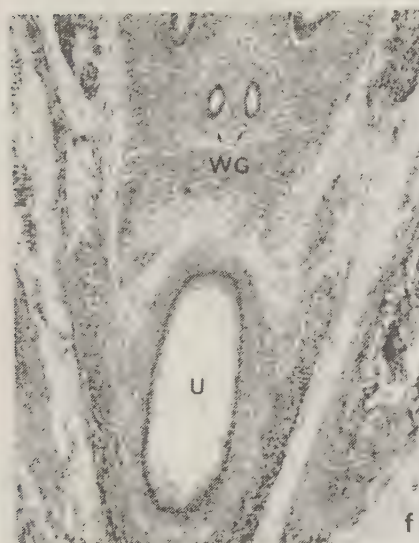
Querschnitte durch männliche Rattenfoeten, deren Mütter vom  
13. - 21. Tag p. c. behandelt wurden

d) 3 mg Flutamid/Tag; e) 10 mg Flutamid/Tag; f) 30 mg Flutamid/Tag;  
g) 30 mg Cyproteronacetat/Tag

Auch hier ist die dosisabhängige Hemmung der Prostataentwicklung  
deutlich. Bei 30 mg Flutamid (f) ist die Prostataentwicklung  
vollständig gehemmt, im Gegensatz zu 30 mg Cyproteronacetat (g),  
wo noch ein Spross zu erkennen ist. Die Form der Urethra ändert  
sich ebenfalls dosisabhängig

Vergrößerung: d - f) ca. 115fach, g) ca. 75fach

DE = Ducti ejaculatorii; P = Prostatasprossen; SB = Samenblasen;  
R = Rektum; WG = Wolff'sche Gänge



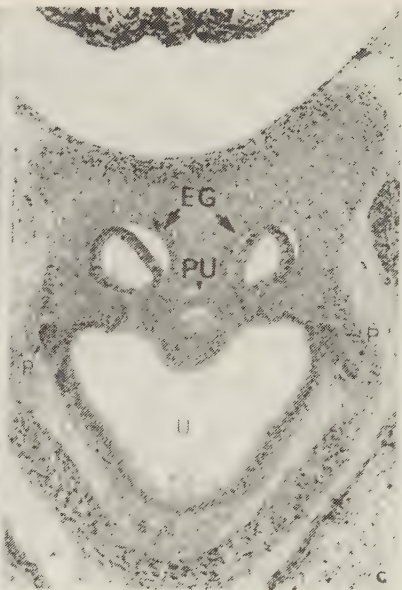


Abb. 17: DER EINFLUSS VON FLUTAMID AUF DEN UTRICULUS PROSTATICUS:

Querschnitte durch männliche Rattenfoeten, deren Mütter vom 13. - 21. Tag p.c. behandelt wurden

- a) männliche Kontrolle 2. Schnitt; b) 0,3 mg Flutamid/Tag 1. Schnitt;  
c) 1 mg Flutamid/Tag 2. Schnitt

Die dargestellten Querschnitte stellen den Schnitt dar, bei dem der Utrikel sein größtes Ausmaß besitzt.

Vergrößerung: a) ca. 150fach, b + c) ca. 115fach

EG = Ejakulationsgänge; P = Prostatasprosse; PU = Prostatautrikel;

U = Urethra

Fortsetzung von Seite 46

Abb. 17: DER EINFLUSS VON FLUTAMID AUF DEN UTRICULUS PROSTATICUS:

Querschnitte durch männliche Rattenfoeten, deren Mütter vom 13.  
- 21. Tag p.c. behandelt wurden.

d) 3 mg Flutamid/Tag 4. Schnitt; e) 10 mg Flutamid/Tag 7. Schnitt;  
f) 30 mg Flutamid/Tag 7. Schnitt; g) 30 mg Cyproteronacetat/Tag  
4. Schnitt

Die dargestellten Querschnitte stellen den Schnitt dar, bei dem  
der Utrikel sein größtes Ausmaß besitzt.

Man beachte die dosisabhängige Vergrößerung des Utrikels. Mit  
Cyproteronacetat wurde nicht diese Dilatation erreicht.

Gut erkennbar ist auch die zunehmende Vergrößerung der Ejakula-  
tionsgänge mit steigender Dosis Flutamid sowie eine Formverän-  
derung der Urethra, die bei hohen Dosen von Flutamid von der  
Kontrolle stark abweicht.

Zu beachten ist, daß sich die Lage des Utrikels verändert hat.  
Schon ab 3 mg sind in der Höhe des größten Utrikeldurchmessers  
keine Prostatasprosse (d) mehr erkennbar, Rektum und Urethra haben  
sich genähert (d).

Vergrößerung: d und g) ca. 45fach, e und f) ca. 115fach

EG = Ejakulationsgränge; P = Prostatasprosse; PU = Prostatautrikel;

U = Urethra





Abb. 18:

Querschnitt durch einen männlichen Fattenfoet, dessen Mutter mit 10 mg Flutamid/Tag vom 13. - 21. Tag p. c. behandelt wurde.

Deutlich ist die Bildung einer VAGINA erkennbar, das Epithel verbindet sich mit dem Epithel der Urethra unter Bildung einer Sinusvagina. Vergrößerung: ca. 75fach

EG = Ejakulationsgänge; R = Rektum; U = Urethra; V = Vagina

## 6. DISKUSSION

Zwei Fragen standen im Mittelpunkt dieser Untersuchung:

1. Wie stark wirkt Flutamid im Vergleich zu dem steroidalen Antiandrogen Cyproteronacetat an Ratten feminisierend?
2. Kommt es unter Flutamid zur Regression der Wolff'schen Gänge oder nicht?

ad 1: Anhand der gut objektivierbaren Parameter Anogenitalabstand und Länge der Urethra wird erkennbar, daß Flutamid 10 x stärker feminisierend wirkt als Cyproteronacetat. Im Vergleich zu dem ebenfalls antiandrogenen wirksamen Spironolacton ist Flutamid ca. 100 x wirksamer (siehe Abb. 13 und 14).

Abgesehen von den Wolff'schen Gängen und deren Derivaten, den Samenblasen (darauf wird später eingegangen), waren alle androgenabhängigen Differenzierungsschritte dosisabhängig gehemmt. Dazu gehörten die Nichtanlage von Prostatasprossen, die Differenzierung des Sinus urogenitalis im weiblichen Sinne, einschließlich der Anlage einer Vagina sowie eine weibliche Differenzierung des äußeren Genitales.

Die Auswertung der Prostatasprosse erfolgte semiquantitativ. Bei einer Dosis von 30 mg Flutamid/Muttertier/Tag sind Prostatasprossen überhaupt nicht mehr nachweisbar - im Gegensatz zur gleichen Dosis Cyproteronacetat; d.h. auch hinsichtlich dieses Parameters ist Flutamid stärker antiandrogen wirksam als Cyproteronacetat.

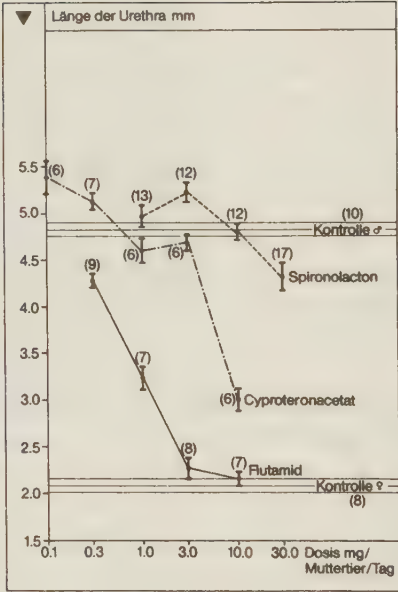
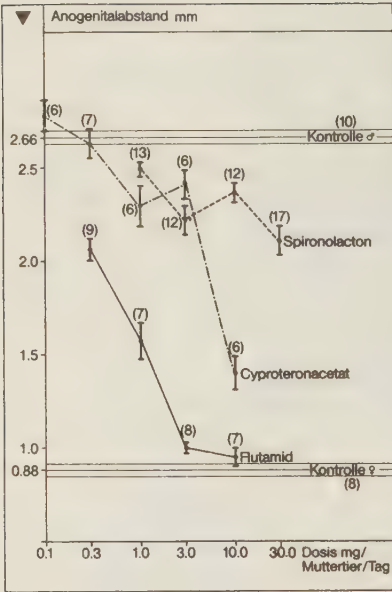


Abb. 19:

Abb. 20:

DER EINFLUSS VON FLUTAMID, CYPROTERONACETAT UND SPIRONOLACTON AUF DEN ANOGENITALABSTAND sowie auf die LÄNGE DER URETHRA von männlichen Rat-tenfoeten, deren Muttertier vom 13. - 21. Tag p.c. (Flutamid) bzw. vom 17. - 20. Tag p.c. behandelt wurden.

Die Werte für Cyproteronacetat und Spironolacton wurden früheren Untersuchungen entnommen. Die unterschiedliche Behandlungsdauer dürfte sich nicht auswirken, weil die Differenzierung der gemessenen Parameter erst mit dem 17. Tag p.c. geschlechtsunterschiedlich verläuft.

Die Anlage einer Sinusvagina ist von Dosen ab 3 mg Flutamid zu beobachten. Von Cyproteronacetat müssen 10 - 30 mg verabfolgt werden, um diesen Vorgang zu induzieren (Neumann et al. 1970). Auch hinsichtlich dieses semiquantitativ erfaßbaren Parameters ist Flutamid weitaus wirksamer als Cyproteronacetat.

Falls Flutamid einmal als Therapeutikum für androgenbedingte Erkrankungen bei der Frau, wie Akne und Hirsutismus eingesetzt werden sollte, muß man das Feminisierungsrisiko berücksichtigen.

ad 2: Eindeutig waren die Befunde nach Gabe von Cyproteronacetat an Hunden und Kaninchen, weniger eindeutig waren die Befunde an Nagern und Meerschweinchen (Elger et. al. 1971, Gräf and Neumann 1972; Elger et al. 1974).

Bei entsprechend hohen Dosen von Cyproteronacetat unterblieb bei Hunden und Kaninchen die Differenzierung aller androgenabhängigen Strukturen. Es kam zur Regression der Wolff'schen Gänge, accessorische Geschlechtsdrüsen waren nicht angelegt, das äußere Genitale hatte eine Differenzierung im weiblichen Sinne erfahren, einschließlich der Anlage einer Vagina (Steinbeck et al. 1970; Elger 1966). dieses Antiandrogen hemmt aber bei diesen Spezies sowohl die testosteronabhängige Stabilisierung der Wolff'schen Gänge, als auch die dihydrotestosteronabhängige (Wilson 1973) Differenzierung des äußeren Genitales.

Wie eingangs bereits erwähnt, führt Cyproteronacetat bei Ratten und Mäusen nicht zur Regression der Wolff'schen Gänge, obwohl alle anderen androgenabhängigen Prozesse vollständig gehemmt waren.

Es wurden verschiedene Hypothesen entwickelt, warum Cyproteronacetat bei Ratten - auch in extrem hohen Dosen verabfolgt - nicht die Regression der Wolff'schen Gänge induziert. Jost (Jost's Diskussionsbemerkung bei Neumann et al, 1970) hat spekuliert, daß die Stabilisierung der

Wolff'schen Gänge bei Ratten möglicherweise vor dem 18. Tag der Foetalentwicklung erfolgt und daß Cyproteronacetat vor Tag 18 möglicherweise nicht in der Lage ist, die Plazentabarriere zu überbrücken (Jost's Diskussionsbemerkung bei Neumann F., Elger W. and Steinbeck H. 1970). Dies hat sich aber nicht bestätigt, denn es konnte gezeigt werden, daß Cyproteronacetat in der Lage war, die durch Behandlung gravider Ratten mit Methyltestosteron erfolgte Stabilisierung der Wolff'schen Gänge bei den weiblichen Foeten dosisabhängig aufzuheben (Elger W., et al., 1970).

In diesem Versuch erfolgte die Behandlung vom Tag 13 an. Eine andere Hypothese ging davon aus, daß möglicherweise so hohe lokale Androgenkonzentrationen im Bereich der Wolff'schen Gänge vorliegen, daß Cyproteronacetat aufgrund des Wirkungsmechanismus (kompetitiver Antagonismus) nicht in der Lage ist, die Wirkung der Androgene aufzuheben (Neumann F., Elger, W. and Steinbeck H. 1970). Obwohl diese Hypothese wenig wahrscheinlich ist, ist sie nicht völlig zu widerlegen. Sie ist deshalb wenig wahrscheinlich, weil selbst Dosen, die um den Faktor 3 über denen liegen, die andere Strukturen maximal feminisieren, keine Destabilisierung der Wolff'schen Gänge bewirken. Es ist auch wenig wahrscheinlich, daß bei Ratten die Differenzierung der Wolff'schen Gänge anders gesteuert wird als bei anderen Spezies, bei denen ja Cyproteronacetat zur Regression der Wolff'schen Gänge bei den männlichen Foeten geführt hatte.

Eine weitere Hypothese besagte, daß bei Ratten die Stabilisierung der Wolff'schen Gänge nicht durch Testosteron geschieht, sondern durch ein anderes Androgen, dessen Wirkung durch Cyproteronacetat nicht aufgehoben wird. Diese Hypothese ist ganz und gar unwahrscheinlich. In einer Vielzahl von Versuchen wurde gezeigt, daß dieses Antiandrogen in der Lage ist, die Wirkung eines jeden Androgens aufzuheben (Übersicht bei Neumann F. and Steinbeck H. 1974), ja sogar androgene Partialwirkungen von syntheti-

schen Gestagenen wurden durch Cyproteronacetat blockiert. Es blieb als wohl letzte Erklärung die Möglichkeit, daß Cyproteronacetat, soweit es die Wolff'schen Gänge betrifft, partiell androgen wirkt. In diese Richtung wiesen auch die bereits erwähnten Untersuchungen an Meerschweinchen. Wenn dies so wäre, dann sollte man erwarten, daß andere potente Antiandrogene mit ganz anderer chemischer Struktur sehr wohl in der Lage sein müßten, die Wolff'schen Gänge bei Ratten zu destabilisieren.

Wie in den vorliegenden Untersuchungen gezeigt wird, verhält sich Flutamid ebenso wie Cyproteronacetat. Selbst bei der extrem hohen Dosis von 30 mg Flutamid sind die Wolff'schen Gänge beidseitig erhalten. Allenfalls sind bei höheren Dosen die Lumina in den caudalen Abschnitten der Wolff'schen Gänge gering reduziert. Schwer interpretierbar ist die dosisabhängige Zunahme der Gesamtlänge der Wolff'schen Gänge. Ob Cyproteronacetat einen ähnlichen Effekt ausübt, kann nicht gesagt werden, weil mit diesem Antiandrogen semiquantitative Untersuchungen dieser Art nicht durchgeführt wurden.

Auch die Derivate der Wolff'schen Gänge, die Samenblasen, sind auch bei der höchsten Flutamiddosis erhalten. Bei den höheren Konzentrationen fällt eine Abnahme der Lumina auf. Schwer interpretierbar ist die geringe Länge und Dilatation der Samenblasen bei niedrigeren Dosen von Flutamid. Auch hinsichtlich des (nahezu fehlenden) Effekts auf die Samenblasen unterscheidet sich Flutamid qualitativ nicht von Cyproteronacetat.

Das gleiche gilt für den Einfluß auf die Ducti ejaculatorii und den Utriculus prostaticus. Es kommt dosisabhängig zu einer Verlängerung und Dilation der Ducti ejaculatorii. Von Dosen ab 3 mg münden die Ducti ejaculatorii z. T. nicht mehr direkt in den Sinus urogenitalis, sondern in den

Utriculus prostaticus, der Anschluß hat an die bei feminisierten Tieren entstandene Sinusvagina. Der Utriculus prostaticus war dosisabhängig stärker entwickelt als bei den Kontrollen.

Hinsichtlich der Effekte auf die Ducti ejaculatorii und der Utriculi prostatici gibt es zwischen Flutamid und Cyproteronacetat aber ebenfalls keine qualitativen Unterschiede.

Es bleibt also nach wie vor unklar, warum Antiandrogene bei Ratten - im Gegensatz zu anderen Spezies - nicht in der Lage sind, die Wolff'schen Gänge zu destabilisieren. Keine der diskutierten Hypothesen ist plausibel.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Zwei Ziele sollten mit dieser Arbeit verfolgt werden:

Erstens sollte untersucht werden, wie stark Flutamid im Vergleich zu dem Standardantiandrogen Cyproteronacetat männliche Rattenfoeten feminisiert. Für den Fall, daß das nichtsteroidale Antiandrogen Flutamid einmal zur Therapie von Androgenisierungserscheinungen bei der Frau angewandt werden sollte, ist es wichtig, daß Feminisierungsrisiko abschätzen zu können.

Zweitens sollte untersucht werden, ob Flutamid im Gegensatz zu Cyproteronacetat eine Regression der Wolff'schen Gänge bewirken kann.

Gravide Han-Vistar-Ratten wurden vom 13. - 21. Tag p.c. mit 0,3, 1, 3, 10 und 30 mg Flutamid/Muttertier/Tag s. c. behandelt. Eine Gruppe (positive Kontrolle) erhielt 30 mg Cyproteronacetat/Muttertier/Tag. eine Kontrollgruppe wurde nur mit dem Vehikel behandelt. Die Autopsie und Entnahme der Foeten erfolgte am 22. Tag der Gravidität.

Zur Beantwortung der gestellten Fragen kamen zwei verschiedene histologische Schnitttechniken zur Anwendung. Die Sagittalschnitttechnik erlaubt eine Quantifizierung der Feminisierungsstärke. Zur Beurteilung der Effekte auf die Wolff'schen Gänge und Samenblasen wurden transversale Serienschnitte angefertigt. Gemessen an den objektiven Parametern Anogenitalabstand und Länge der Urethra ist Flutamid 10 x wirksamer als Cyproteronacetat und 100 x stärker als Spironolacton.

Auch hinsichtlich anderer Feminisierungsparameter, wie Vorhandensein von Prostatasporen oder Anlage einer Vagina, ist Flutamid weitaus wirksamer als Cyproteronacetat.

Hinsichtlich des Einflusses auf Wolff'sche Gänge, Samenblasen, Ducti ejaculatorii und Utriculus prostaticus unterscheidet sich Flutamid qualitativ nicht von Cyproteronacetat. Auch Flutamid führt zu keiner Regression der Wolff'schen Gänge und Samenblasen.

Es wurden verschiedene Hypothesen entwickelt, warum Cyroteronacetat bei männlichen Rattenfoeten nicht zur Regression der Wolff'schen Gänge führt. Eine dieser Hypothesen ging davon aus, daß Cyproteronacetat an den Wolff'schen Gängen männlicher Rattenfoeten agonistisch (androgen) wirken könnte. Diese Hypothese wurde mit der vorliegenden Untersuchung widerlegt, denn für Flutamid wurden in keinem Testmodell und bei keiner Spezies agonistische oder partial-agonistische Wirkungen gefunden.

Keine der diskutierten Hypothesen ist plausibel. Es bleibt also nach wie vor offen, warum Antiandrogene bei männlichen Rattenfoeten im Gegensatz zu anderen Spezies wie Hund oder Kaninchen nicht in der Lage sind, die Wolff'schen Gänge zu destabilisieren.

Literaturverzeichnis

ALLEN, E. and Doisy, E.A.:

An ovarian hormone-preliminary report on its  
localization extraction and partial purification, and  
action in testanimals.  
J. Amer. med. Ass. 81, 819 - 1923

ELGER, W.:

Die Rolle der fetalen Androgene in der Sexualdifferenzierung des Kaninchens und ihre Abgrenzung gegen andere hormonale und somatische Faktoren durch Anwendung eines starken Antiandrogen.  
Arch. Anat. microsc. Morph. exp. 55, 657 - 743 - 1966

ELGER, W., Gräf, K.-J., Steinbeck, H. and Neumann, F.:

Hormonal control of sexual development  
Advances in the Biosciences 13 - 1974

ELGER, W. Neumann, F. and von Berswordt-Wallrabe, R.:

The influence of androgen antagonists and progestogens on the sex differentiation of different mammalian species-  
Edited by Max Hamburgh and E.J.W. Barrington  
Reprinted from: Hormones in Development  
Published by Appleton-Century-Crofts, New York  
Educational Division, Meredith Corporation - 1971

ELGER, W., Steinbeck, H., Cupceancu, B. and  
Neumann, F.:

Influence of methyltestosterone and cyproterone acetate on wolffian duct differentiation in female rat fetuses  
J. Endocrinol, 47, 417 - 422 - 1970

GRÄF, K.-J. and Neumann, F.:

Influence of Cyproteron acetat on sexual differentiation of male guinea pigs  
Z. Anat. Entwickl.-Gesch., 137, 200 - 220 - 1972

GRAF, K.-J., Kleinecke, R.-L., and Neumann, F.:

The stimulation of male duct derivatives in female guinea-pigs with an antiandrogen, cyproterone acetate  
J. Reprod. Fert. 39, 311 - 317 - 1974

HAMADA, H., Neumann, F., Junkmann, K.:

Intrauterine antimaskuline Beeinflussung von Rattenfoeten durch ein stark gestagen wirksames Steroid  
Acta endocr. (Kbh) 44, 380 - 1963

JOST'S Diskussionsbemerkung bei  
F. Neumann, W. Elger and H. Steinbeck:

Antiandrogens and reproductive development  
Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B. 259, 179 - 184 - 1970

JOST, A.:

Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. -  
Recent Progr. Horm. Res. 8: 379 - 1953

JOST, A.:

Embryonic sexual differentiation (morphology, physiology, abnormalities); in Jones and Scott  
Hermaphroditism, genital anomalies and related endocrine disorders; p. 15  
Williams Wilkins, Baltimore - 1958

JOST, A.:

Gonadal hormones in the sex differentiation of the mammalian fetus. -  
In: Organogenesis (Eds. de Haan, R. L., Ursprung, H.)  
New York: Holt, Rinehart and Winston inc. - 1956

JOST, A.:

Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. I. Introduction et embryologie génitale normale.  
Arch. Anat. micr. Morph. exp. 36, 151 - 1947 a

JOST, A.:

Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. II. Action des androgènes de synthèse sur l'histogenèse génitale.  
Arch. Anat. micr. Morph. exp. 36, 242 - 1947 b

JOST, A.:

Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. III. Rôle des gonales totales dans la différenciation sexuelle somatique.

Arch. Anat. micr. Morph. exp. 36, 271

- 1947

NEUMANN, F.:

Methods for evaluating antisexual hormones.  
Proceedings of the Int. Symposium, "Methods in Drug Evaluation"  
Mailand 1965

North-Holland Publ., Compny, pp. 548- 573

- 1966

Neumann, F. et al.:

Androgenisation in women

S. 147 - 192 Lectures and discussions of a symposium, Berlin, 23rd - 24th February 1979

- 1979

Neumann, F.:

"Sexualhormone"

Physiologie des Menschen Bd. 19

Gauer-Kramer Jung

- 1977

Neumann, F.:

Endokrinologische Aspekte der Geschlechtsdifferenzierung

Gynäkologie 9, 16-29

- 1976

Neumann, F., von Berswordt-Wallrabe, R., Elger, W.,  
Steinbeck, H., Hahn, J. D., Kramer, M.:

"Aspects of androgen-dependent events as studied by antiandrogens.

Recent Progr. Hormone Res. 26, 337

- 1970a

Steinbeck, H., Neumann, F., Elger, W.:

Effect of an antiandrogen on the differentiation of the internal genitalorgan on dogs

J. Reprod. Fertil. 23, 223

- 1970

Androgenization in Women  
S. 147 - 192 F. Neumann et al.  
S. 221 - 238 J. Hammerstein

Lectures and discussions of a symposium,  
Berlin 23rd - 24th February 1979

ÜBERSICHT bei  
Neumann, F. and Steinbeck, H.:

Antiandrogens  
Handbuch der experimentellen Pharmakologie,  
Volume XXV/2 - 1974

Androgenization in Women  
S. 7 - 20  
N. Bruchofsky  
Lectures and discussions of a symposium, Berlin 23rd  
- 24th February 1979

WILSON, Y. D.:

Testosterone uptake by the urogenital tract of the  
rabbit embryo  
Endocrinology 92: 1192 - 1973

## LEBENS LAUF

|                       |                                                                                           |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| 21. Juni 1945         | geb. in Dresden<br>Vater: Engelbert Koch<br>Mutter: Sigrid Koch geb. Engelbrecht          |
| 1951 - 1956           | Stechlinsee-Grundschule, Berlin                                                           |
| 1956 - 1961           | Hildegard-Wegscheider Schule,<br>Berlin                                                   |
| 1962 - 1964           | Liebig-Schule, Berlin<br>(Chemiefachschule)<br>Abschluß als chem.-techn Assistentin       |
| Arbeitsverhältnisse:  |                                                                                           |
| 1964 -1966            | Bundesanstalt für Material=<br>prüfung, Berlin                                            |
| 1967 - 1969           | Nobel-Bozel, Paris/Frankreich                                                             |
| 1.12.69-31.12.1978    | Freie Universität Berlin                                                                  |
| Nov. 1971 - 1975      | Berliner Abendgymnasium f.<br>Berufstätige mit Abschluß der<br>Allgemeinen Hochschulreife |
| April 1977- März 1984 | Studium der Humanmedizin an der<br>Freien Universität Berlin                              |
| 18.4. 1984            | Approbation als Ärztin                                                                    |
| 1.5.1984              | Assistenzärztin im Ev. Waldkranken=<br>haus Spandau, Gynäkologische Abteilung             |



### DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich Herrn Professor Dr. F. Neumann sehr herzlich danken für die Vergabe des Themas sowie für die Möglichkeit, die er mir geboten hat, unter seiner Anleitung diese Promotionsarbeit zu erstellen, ebenso der Firma Schering für die großzügige Bereitstellung des notwendigen Arbeitsmaterials.

Auch möchte ich allen Mitarbeitern des Dep. Endokrinologie, insbesondere Frau B. Sperling, danken für die freundliche Unterstützung, die sie mir während dieser Arbeit gegeben haben.





